

University of Groningen

Involvement of microRNAs in T-cell immunity

Śmigielska-Czepiel, Katarzyna Anna

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Śmigielska-Czepiel, K. A. (2014). *Involvement of microRNAs in T-cell immunity: Functional analysis of microRNAs in Health and in Rheumatoid Arthritis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

STRESZCZENIE

Limfocyty T CD4⁺ odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej, jednak molekularne mechanizmy odpowiedzialne za ich rozwój i funkcję pozostają nadal w sferze intensywnych badań. Istotną rolę w tych procesach odgrywają microRNA (miRNA).

MiRNA są małymi, około 22 nukleotydowymi cząsteczkami RNA, które w przeciwieństwie do mRNA, nie kodują białek. MiRNA wiążą się z cząsteczkami mRNA kodującymi białka, indukując ich degradację, lub blokując proces translacji, co skutkuje obniżoną produkcją białka. W ten sposób miRNA modulują poziom ekspresji białek w komórce. Poprzez swoją funkcję miRNA biorą udział w regulacji wielu procesów biologicznych, zapewniając równowagę fizjologiczną zarówno na poziomie komórki jak i organizmu [1]. U człowieka odkryto do tej pory około 2500 różnych miRNA [2]. Wyróżniamy miRNA powszechnie występujące w wielu typach komórek, jak i miRNA specyficzne dla danego typu tkanki [3]. Zmiany w puli komórkowego miRNA, dotyczące zarówno ilości jak i rodzaju miRNA mogą prowadzić do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu komórki. Nie jest zatem zaskakujące, że choroby związane z zaburzeniami na poziomie komórkowym, takie jak np. choroby nowotworowe charakteryzują się znacznie zmienionym składem miRNA [4].

Układ odpornościowy charakteryzuje się różnorodnością komórek pełniących swoje funkcje w procesie odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, wiele typów komórek układu odpornościowego ulega aktywacji w trakcie kontaktu z patogenami, co wywołuje w nich znaczne zmiany morfologiczne jak i funkcjonalne. Przykładem takich zmian jest aktywacja limfocytów T na skutek napotkania antygeny (np. białek bakteryjnych lub wirusowych). Przed rozpoznaniem antygeny, limfocyty T charakteryzują się fenotypem naiwnym, tj. małymi rozmiarami, dużym jądrem komórkowym oraz brakiem zdolności do produkcji cytokin. Rozpoznanie antygeny indukuje proces aktywacji i przemianę w limfocyty efektorowe o większych rozmiarach. Komórki te nabywają zdolność do produkcji cytokin, wspomagają odpowiedź immunologiczną oraz wspierają limfocyty B przy produkcji przeciwciał [5]. Po okresie efektorowym trwającym ok. 1-2 tygodni, większość komórek efektorowych ginie pozostawiając w obiegu jedynie pulę komórek pamięci, które zapewniają tzw. „pamięć immunologiczną” i umożliwiają szybszą odpowiedź przy powtórny kontakt z antygenem [6]. Ostatnie badania, łącznie z badaniami opisanymi w tej pracy pokazują, że każdy z różnych typów komórek układu odpornościowego charakteryzuje się odmiennym składem miRNA. Ten charakterystyczny zestaw miRNA, specyficzny dla danej populacji komórek nazywany jest profilem miRNA. Niektóre miRNA, obecne w wielu typach komórek immunologicznych na średnim poziomie, są wyjątkowo

wysoko ekspresjonowane w jednym szczególnym typie komórek. Takie miRNA nazywamy specyficznymi dla danego rodzaju komórek [7]. Rola wielu miRNA jest nadal nieznana i wymaga dalszych badań. Dzięki badaniom z udziałem modeli zwierzęcych wiadomo natomiast, że zarówno całkowite zahamowanie produkcji miRNA [8], jak i zahamowanie produkcji poszczególnych miRNA (np. miR-146a) w komórkach układu odpornościowego prowadzi do poważnych zaburzeń w regulacji odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji do rozwoju chorób autoimmunologicznych [9-11]. W dotychczasowych badaniach zaobserwowano korelację pomiędzy zaburzeniami ekspresji miRNA w limfocytach T, a chorobami o podłożu autoimmunologicznym takimi jak stwardnienie rozsiane czy toczeń rumieniowaty układowy [12,13]. Niedawne badania wykazały szczególną wrażliwość na zaburzenia ekspresji miRNA w populacji limfocytów T CD4⁺ regulatorowych (Treg) [14-16], które charakteryzują się wysoką ekspresją podjednostki α receptora IL-2 (CD25), co odróżnia je od większości pozostałych limfocytów T (Tconv). Populacja ta jest stosunkowo mała i stanowi ok. 2-5% limfocytów T. Limfocyty Treg odgrywają ważną rolę w hamowaniu nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, zabezpieczając tym samym organizm przed rozwojem autoagresji [17]. Niedawne badania wykazały, że limfocyty Treg, tak jak limfocyty Tconv, występują zarówno w fenotypie naiwnym jak i w fenotypie pamięci [18]. Jednakże profil miRNA charakteryzujący te subpopulacje limfocytów Treg nie jest do tej pory znany.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest chorobą autoimmunologiczną, która dotyka stawy i może prowadzić do ich nieodwracalnej degeneracji. Etiologia RZS jest złożona i wciąż daleka od wyjaśnienia. Ból i obrzęki stawów, będące objawami choroby, są konsekwencją procesu zapalnego toczącego się w ich błonie maziowej. Komórki układu odpornościowego, naciekające miejsce zapalenia, wzmagają proces zapalny poprzez niekontrolowaną produkcję prozapalnych mediatorów. Takie środowisko sprzyja aktywacji synowocytów, makrofagów oraz różnicowaniu osteoklastów, które razem pośredniczą w procesie niszczenia chrząstki i resorpcji kości [19,20]. Pomimo obecności wielu limfocytów Treg w obrębie błony maziowej stawu, stan zapalny utrzymuje się, sugerując nieprawidłowe funkcjonowanie tych komórek [21]. Liczne badania wykazały wadliwe funkcjonowanie limfocytów Treg u pacjentów z RZS. Jednocześnie wyniki innych badań wskazują, iż prozapalne środowisko obecne w stawie moduluje zachowanie limfocytów Tconv i zmniejsza ich wrażliwość na supresorowe działanie limfocytów Treg [22-24]. Nieprawidłowa ekspresja miRNA została niedawno wykryta w tkance maziowej, w płynie maziowym i limfocytach T wyizolowanych z płynu maziowego pacjentów z RZS sugerując, że rozregulowana ekspresja miRNA może być związana z przebiegiem tej choroby [25-28].



Celem badań opisanych w niniejszej pracy było zbadanie profilu miRNA w różnych subpopulacjach komórek T, a w szczególności w limfocytach Treg pobranych od pacjentów z RZS. Badania te są opisane w rozdziałach 2 i 5. Drugim celem niniejszej pracy było zbadanie roli poszczególnych miRNA w fizjologicznym i patologicznym funkcjonowaniu limfocytów T CD4+. Badania te są przedstawione w rozdziałach 3, 4 i 6.

Rozdział 1 zawiera ogólne informacje na temat biogenezy i funkcji miRNA, roli miRNA w limfocytach T, jak również informacje dotyczące RZS.

Celem badań opisanych w **rozdziale 2** było **a)** zbadanie profilu ekspresji miRNA w limfocytach CD4+ Treg i limfocytach konwencjonalnych (Tconv), uzyskanych od zdrowych dawców i pacjentów z RZS; **b)** analiza profilu miRNA w czterech populacjach limfocytów, tj. limfocytach Treg i Tconv z uwzględnieniem fenotypu naiwnego i fenotypu pamięci. Komórki użyte w eksperymentach oczyszczono z krwi obwodowej korzystając z metody sortowania FACS. Profil miRNA oznaczono stosując metodę mikromacierzy. Ekspresję wybranych miRNA zweryfikowano u niezależnej grupie pacjentów i zdrowych dawców za pomocą metody qRT-PCR. Stężenie cytokin prozapalnych (IL-6 i TNFα) oznaczano w surowicy dawców stosując multipleksowy test ELISA. Wyniki wykazały, że ekspresja miRNA, w analizowanych populacjach limfocytów, nie różni się znacząco pomiędzy pacjentami z RZS, a zdrowymi dawcami. Ekspresja jednego miRNA, miR-451, była skorelowana z aktywnością RZS, a także z poziomem IL-6 oznaczonym w surowicy. Analiza czterech subpopulacji limfocytów T wykazała, iż każda subpopulacja charakteryzuje się odmiennym profilem miRNA. Analiza miRNA oznaczonych w limfocytach Treg o fenotypie naiwnym i pamięci wykazała, że miRNA uznawane do tej pory za specyficzne dla limfocytów Treg, tj. miR-21 lub miR-155, są specyficzne jedynie dla Treg o fenotypie pamięci. Badanie to umożliwiło oznaczenie miRNA prawdziwie specyficznych dla limfocytów Treg, np. miR-146a. Wyniki te są podstawą do dalszych badań mających na celu weryfikację roli poszczególnych miRNA w funkcjonowaniu limfocytów Treg. Wyniki te wskazują ponadto, iż niezmiernie ważne jest wykonywanie analizy w oczyszczonej i dobrze określonej populacji komórek T. W sytuacji, gdy miRNA analizowane są w całkowitej populacji limfocytów T, istotny jest odpowiedni dobór zdrowych dawców, gdyż zmiana składu populacji limfocytów T, np. w wyniku przebytej infekcji skutkującej wzrostem populacji limfocytów pamięci, może istotnie wpływać na odczyt ekspresji miRNA.

W **rozdziale 3** zanalizowano kinetykę ekspresji czterech wybranych miRNA; miR-21, miR-146a, miR-155 i miR-31, podczas aktywacji limfocytów T CD4+, o fenotypie

naiwnym. MiR-21, miR-146a i miR-155, zostały wybrane ze względu na znacząco wyższą ekspresję w komórkach pamięci, podczas gdy miR-31 został uwzględniony ze względu na znacząco niższą ekspresję w tych komórkach. Komórki użyte w eksperymentach oczyszczono z krwi obwodowej zdrowych dawców korzystając z metody sortowania FACS a następnie aktywowano stosując przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorom CD3 i CD28. Ekspresja trzech z czterech miRNA; miR-21, miR-146a i miR-155 uległa znacznej indukcji w czasie trwania aktywacji, podczas gdy ekspresja miR-31 uległa zmniejszeniu. Wyniki te ukazują, że aktywacja limfocytów T znacząco wpływa na zmianę ekspresji miRNA. Wyniki sugerują również, że wyżej wymienione miRNA są zaangażowane w proces aktywacji limfocytów T. MiR-21 jest szczególnie interesujący ze względu na swoją funkcję znaną z onkologii, gdzie jest on określany jako „Onco-miR”, gdyż promuje proliferację i hamuje apoptozę komórek nowotworowych [29]. Indukcja ekspresji miR-21 podczas aktywacji limfocytów T może więc wpływać na ich przeżywalność.

W **rozdziale 4** przeanalizowano wpływ indukowanej ekspresji miR-21 na funkcję aktywowanych limfocytów T. Komórki o fenotypie naiwnym oraz komórki o fenotypie pamięci oczyszczono z krwi obwodowej zdrowych dawców korzystając z metody sortowania FACS a następnie aktywowano stosując przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorom CD3 i CD28 w obecności lub braku inhibitora miR-21. W trakcie doświadczenia analizowano przeżywalność komórek a także poziom ekspresji genów związanych ze stanem aktywacji, w obecności lub przy braku inhibitora miR-21. Otrzymane wyniki wskazują, iż funkcja miR-21 różni się znacząco w zależności od fenotypu limfocytu T. W aktywowanych limfocytach T pamięci, miR-21 zapobiega przedwczesnej śmierci komórki na drodze apoptozy. W aktywowanych, naiwnych limfocytach T, miR-21 obniża ekspresję receptora chemokin - CCR7. Receptor ten jest odpowiedzialny za migrację naiwnych limfocytów T do węzłów chłonnych, gdzie mają możliwość kontaktu z komórkami prezentującymi antygen [30]. Obniżenie ekspresji CCR7 u aktywowanych limfocytów T umożliwia opuszczenie przez nie węzła chłonnego i poszukiwanie antygeny w tkankach obwodowych. Badania opisane w rozdziale 4 ukazują, iż miR-21 może pełnić fundamentalnie różne funkcje w zależności od stanu zróżnicowania limfocytu T.

W **rozdziale 5** powracamy do analizy zachowania limfocytów Treg u pacjentów z RZS. Celem badań była analiza przyczyn akumulacji limfocytów Treg w płynie maziowym pacjentów z RZS. W tym celu przeanalizowano skład populacji limfocytów Treg i Tconv pod kątem fenotypu naiwnego i fenotypu pamięci w materiale pobranym z krwi obwodowej oraz z płynu maziowego pacjentów z RZS, stosując technikę



cytometrii przepływowej. Ponadto, oceniono poziom ekspresji receptorów chemokin (CXCR3, CCR4 i CCR6), odpowiedzialnych za kierunkową migrację limfocytów Treg i Tconv w kierunku tkanek obwodowych. Przeanalizowano również ekspresję wybranych miRNA w limfocytach Treg i Tconv pochodzących z płynu stawowego. Zaobserwowano, że limfocyty Treg o fenotypie pamięci (MTreg), ale nie o fenotypie naiwnym, migrują do płynu stawowego wykorzystując ten sam zestaw receptorów dla chemokin co limfocyty Tconv. Limfocyty MTreg proliferują ponadto w płynie stawowym, nie ulegając przy tym apoptozie, co skutkuje ich akumulacją. Równocześnie komórki te ekspresjonują zwiększoną ilość takich antyapoptotycznych czynników jak Bcl-2 i miR-21. Badania opisane w tym rozdziale wnoszą zatem dodatkowe informacje na temat przyczyn akumulacji limfocytów Treg w płynie maziowym pacjentów z RZS. Ponadto, uzyskane wyniki pokazują, że limfocyty T w stanach zapalnych stawów prezentują głównie aktywowany fenotyp pamięci.

W **rozdziale 6** powracamy do analizy roli miR-21 w funkcjonowaniu limfocytów T. Celem badań było odkrycie genów regulowanych przez miR-21, związanych ze ścieżką apoptozy. Informacja taka umożliwi zrozumienie molekularnych podstaw funkcjonowania miR-21 w warunkach fizjologicznych, jak również w m.in. procesach nowotworowych. Komputerowa analiza komplementarności sekwencji nukleotydowych, pomiędzy miRNA a mRNA umożliwia ocenę prawdopodobieństwa interakcji pomiędzy tymi cząsteczkami. Niemniej jednak, analiza *in silico* obarczona jest wieloma fałszywie pozytywnymi wynikami wymagającymi praco- i czasochłonnej weryfikacji. W celu wiarygodnego określenia genów regulowanych przez miR-21 w limfocytach T, zastosowano więc podejście eksperymentalne, tzw. technikę RIP-Chip [31]. Technika ta opiera się na immunoprecypitacji kompleksów rybonukleoproteinowych, zawierających miRNA i mRNA, przy zastosowaniu przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko endogennemu białku Ago2. mRNA wzbogacone w immunoprecypitowanej frakcji oznaczono korzystając z techniki mikromacierzy. Technika ta umożliwia wydajną analizę genów modulowanych przez dane miRNA w określonym modelu komórkowym. Doświadczenie przeprowadzono w komórkach linii limfocytarnej Jurkat o normalnej ekspresji miR-21 oraz w komórkach o obniżonej ekspresji miR-21. Wyniki zanalizowano pod kątem genów zaangażowanych w procesy immunologiczne oraz w ścieżkę apoptozy. Badania mające na celu weryfikację otrzymanych wyników są w toku.

Rozdział 7 podsumowuje wyniki opisane w rozdziałach poprzedzających oraz przedstawia perspektywy przyszłych badań. Dane zostały omówione w świetle aktualnej wiedzy dotyczącej wpływu miRNA na funkcję limfocytów T.

Badania opisane powyżej są podstawą do wyciągnięcia szeregu ważnych wniosków. Dowodzą one, iż poszczególne subpopulacje limfocytów T charakteryzują się specyficznymi profilami miRNA. Dotyczy to w znacznym stopniu limfocytów T naiwnych oraz pamięci, jak również limfocytów Treg. Wiadomo, iż kompozycja limfocytów T zmienia się z wiekiem (przesunięcie w kierunku zwiększonej ilości limfocytów T pamięci), jak również w wyniku przebytych chorób i infekcji. Dlatego bardzo istotnym jest, aby analiza ekspresji miRNA u chorych i zdrowych dawców przeprowadzana była w oczyszczonych subpopulacjach limfocytów T. Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* pokazują, że zaburzona ekspresja miRNA ma poważne konsekwencje dla funkcjonowania komórek odpornościowych, a tym samym dla równowagi całego układu immunologicznego. Wiedza na temat wpływu poszczególnych miRNA na morfologię i funkcję danej subpopulacji limfocytów pozostaje jednak znikoma. Dane opisane w tej pracy dostarczają nowych informacji na temat wpływu miR-21 na funkcjonowanie limfocytów T oraz na temat genów regulowanych przez to miRNA. Ponadto, doświadczenia opisane w niniejszej pracy pokazują, iż limfocyty T uzyskane z krwi obwodowej pacjentów z RZS nie różnią się znacznie profilem miRNA od limfocytów zdrowych dawców. Niemniej jednak, wzmożona ekspresja poszczególnych miRNA, np. miR-21, może wpływać na przeżywalność i akumulację limfocytów Treg w płynie maziowym pacjentów z RZS.



REFERENCES

1. Bartel DP. (2009) MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.
2. Kozomara A, Griffiths-Jones S. (2011) miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39: D152-7.
3. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8: 166.
4. Di Leva G, Croce CM. (2013) miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 23: 3-11.
5. Zhu J, Paul WE. (2008) CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood* 112: 1557-1569.
6. McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. (2010) The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* 130: 1-9.
7. Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, Curti S, Ripamonti A, et al. (2011) Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4(+) T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol*.
8. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, et al. (2005) T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme dicer. *J Exp Med* 201: 1367-1373.
9. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, et al. (2011) miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med* 208: 1189-1201.
10. Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea CK, et al. (2012) miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med* 209: 1655-1670.
11. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, et al. (2010) Function of miR-146a in controlling treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142: 914-929.
12. Lindberg RL, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L. (2010) Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* 40: 888-898.
13. Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, et al. (2010) MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 184: 6773-6781.
14. Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'Connor E, Graf D, et al. (2006) A role for dicer in immune regulation. *J Exp Med* 203: 2519-2527.
15. Liston A, Lu LF, O'Carroll D, Tarakhovsky A, Rudensky AY. (2008) Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med* 205: 1993-2004.
16. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, et al. (2008) Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 205: 1983-1991.
17. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490-500.
18. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, et al. (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30: 899-911.
19. Firestein GS. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356-361.
20. McInnes IB, Schett G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7: 429-442.
21. Raghavan S, Cao D, Widhe M, Roth K, Herrath J, et al. (2009) FOXP3 expression in blood, synovial fluid and synovial tissue during inflammatory arthritis and intra-articular corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 68: 1908-1915.
22. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, et al. (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200: 277-285.
23. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. (2008) Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19396-19401.
24. Herrath J, Muller M, Amoudruz P, Janson P, Michaelsson J, et al. (2011) The inflammatory milieu in the rheumatic joint reduces regulatory T-cell function. *Eur J Immunol* 41: 2279-2290.
25. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, et al. (2008) Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 1001-1009.

26. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, et al. (2008) Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 58: 1284-1292.
27. Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, et al. (2010) Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R81.
28. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, et al. (2010) Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R86.
29. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. (2010) OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467: 86-90.
30. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. (2008) CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 362-371.
31. Tan LP, Seinen E, Duns G, de Jong D, Sibon OC, et al. (2009) A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res* 37: e137.

